

Antonija Hrnjkaš

**Određivanje metala u maslinovom ulju
primjenom atomske apsorpcijske
spektrometrijske tehnike**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar Turk i suvoditeljstvom dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar Turk i komentorici dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, mag. pharm., spec. kliničke farmacije na trudu, uloženom vremenu i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se i dr. sc. Iliji Klarić na pomoći u provedbi eksperimentalnog dijela rada.

Posebnu zahvalu upućujem Zakladi Adris koja je svojom donacijom omogućila provođenje ovih istraživanja.

Veliko hvala mojoj obitelji, zaručniku i prijateljima na potpori, strpljenju i savjetima prilikom studiranja.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 Atomska apsorpcijska spektrometrija | 2 |
| 1.1.1. Atom i atomska spektroskopija | 2 |
| 1.1.2. Načelo metode atomske apsorpcijske spektroskopije..... | 3 |
| 1.1.3. Kvantitativna analiza atomskom apsorpcijom | 3 |
| 1.1.4. Atomski apsorpcijski spektrometar | 4 |
| 1.1.5. Tehnike za određivanje metala | 5 |
| 1.1.6. Priprema uzoraka u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji | 7 |
| 1.2. Maslinovo ulje | 8 |
| 2 OBRAZLOŽENJE TEME | 10 |
| 3 MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1. Materijali | |
| 3.1.1. Uzorci maslinovog ulja | 13 |
| 3.1.2. Radni instrumenti | 13 |
| 3.1.3. Standardne supstancije | 13 |
| 3.1.4. Ostale korištene kemikalije | 13 |
| 3.1.5. Pribor i posuđe | 13 |
| 3.1.6. Programski paketi | 14 |
| 3.2. Metode | |
| 3.2.1. Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom | 14 |
| 3.2.2. Analize metala u maslinovom ulju grafitnom tehnikom | 15 |
| 3.2.3. Priprema standardnih otopina | 15 |
| 4 REZULTATI I RASPRAVA | 17 |
| 5 ZAKLJUČAK | 21 |
| 6 LITERATURA | 23 |
| 7 SAŽETAK/SUMMARY | 27 |
| 8 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD | |

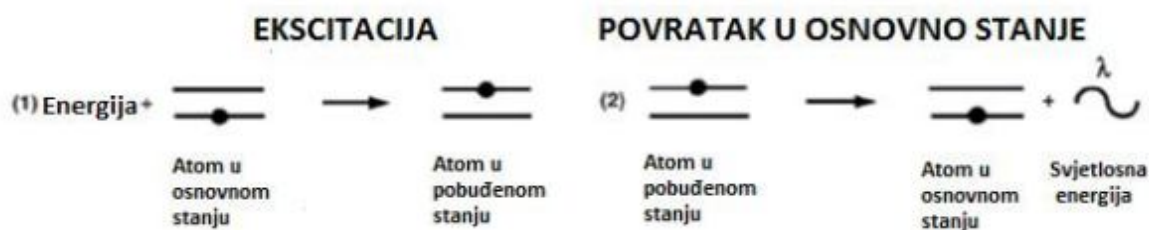
1 UVOD

1.1. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) analitička je metoda za određivanje koncentracije elemenata u uzorku. Otkrio ju je 1956. godine Alan Walsh, a danas se koristi u različitim područjima kemije. Primjerice, u analizi metala u biološkim tekućinama poput krvi i urina, zatim, u praćenju onečišćenja okoliša, utvrđivanjem prisutnosti različitih elemenata kako u zraku, riječnoj i morskoj vodi, tako i u vodi za piće, vinu, pivu i voćnim sokovima. U industriji služi za utvrđivanje prisustva toksičnih onečišćenja u različitim materijalima, npr. sadržaj olova u betonu. Konačno, u analitici lijekova koristi se u ispitivanju onečišćenja i određivanju sadržaja metala (npr. magnezij u talku). Budući da se brojni metali koriste u procesima proizvodnje kao reagensi ili katalizatori te posljedično mogu zaostati, vrlo je važno utvrditi granične vrijednosti metala u gotovim lijekovitim oblicima i spremnicima za lijekove (Nigović 2014; Levinson, 2001).

1.1.1. Atom i atomska spektroskopija

Svaki element ima specifičan broj elektrona povezanih sa svojom jezgrom u orbitalnoj strukturi specifičnoj za pojedini element. Takva konfiguracija, s najnižom energijom poznata je kao osnovno stanje. Dovođenjem određene količine energije, ona se apsorbira te elektron prelazi u manje stabilno stanje, pobuđeno stanje. Obzirom na to da je isto nestabilno, elektron će se spontano vratiti u osnovno stanje otpuštanjem energije koja je ekvivalentna prethodno apsorbiranoj. Proces je prikazan na Slici 1. (Beaty i Kerber, 1993).

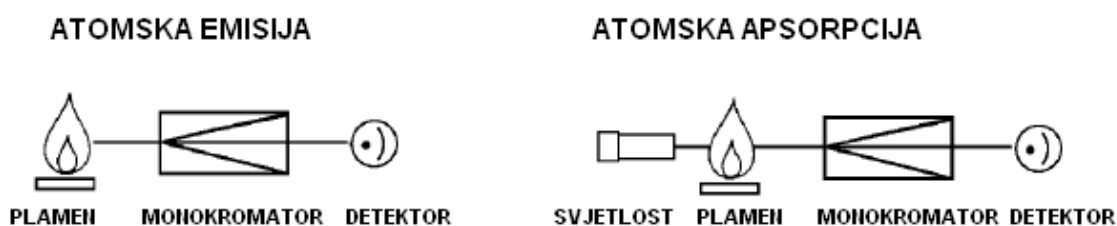


Slika 1. Proces ekscitacije i povratak u osnovno stanje (preuzeto i prilagođeno od: Beaty i Kerber, 1993)

1.1.2. Načelo metode atomske apsorpcijske spektroskopije

Atomi metala koji se nalaze u uzorku toplinskom se energijom prevode u neutralne plinovite atome. U atomskoj emisiji toplinska energija prevodi uzorak u atomski oblak te ekscitira atome u pobuđeno stanje, a njihovim vraćanjem u osnovno stanje, emitira se svjetlost koju instrument detektira. Intenzitet emitirane svjetlosti odgovara koncentraciji ispitivanog elementa.

Za razliku od toga, u atomskoj apsorpciji, za prelazak atoma u pobuđeno stanje potreban je dodatan izvor zračenja. Stoga bivaju još obasjani frekvencijom svjetla te apsorbiraju zračenje i prelaze u pobuđeno stanje (Slika 2.). Valna duljina apsorbiranog zračenja karakteristična je za ispitivani element, a količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je koncentraciji elementa, što čini osnovu za kvantitativnu analizu (Nigović, 2014; Beaty i Kerber, 1993).



Slika 2. Usporedba atomske emisije i apsorpcije (preuzeto i prilagođeno od: Beaty i Kerber, 1993)

1.1.3. Kvantitativna analiza atomskom apsorpcijom

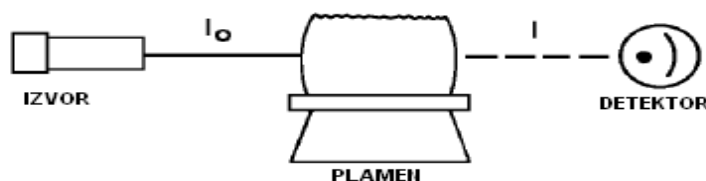
Kao što je prikazano na Slici 3., svjetlost početnog intenziteta, I_0 , usmjerena je na plamenu ćeliju koja sadrži atome osnovnog stanja. Njezin intenzitet smanjen je za količinu koja je određena koncentracijom atoma u ćeliji. Svjetlost je potom usmjerena na detektor koji mjeri reducirani intenzitet, I . Usporedbom I_0 i I određena je količina apsorbirane svjetlosti.

Transmitancija je definirana kao: $T = I/I_0$, tj. u postocima: $T = 100 \times I/I_0$.

Apsorbancija je definirana kao: $A = \log(I_0/I)$, tj. kao: $A = 100 - T(\%)$.

Apsorbancija je najpogodniji termin za karakterizaciju apsorpcije svjetlosti jer je linearna s koncentracijom sukladno Beerovom zakonu: $A = e \times l \times c$ (A - apsorbancija, e - koeficijent

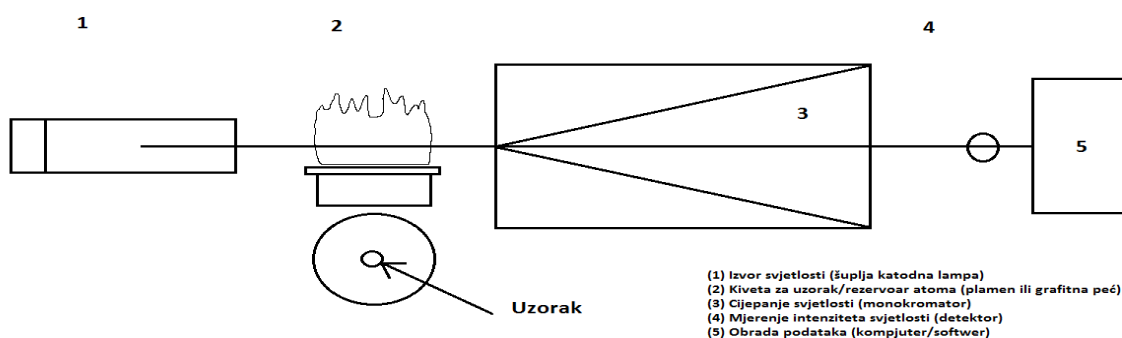
apsorpcije, l - duljina svjetlosnog puta kojeg presijeca analit u ćeliji (širina kivete), c - koncentracija analita) (Beaty i Kerber, 1993).



Slika 3. Proces atomske apsorpcije (preuzeto i prilagođeno od: Beaty i Kerber, 1993)

1.1.4. Atomski apsorpcijski spektrometar

Atomski apsorpcijski spektrometar sastoji se od 5 dijelova: izvor svjetlosti, ćelija s uzorkom, monokromator, detektor te sustav za obradu podataka (Slika 4.).



Slika 4. Shema apsorpcijskog spektrofotometra (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

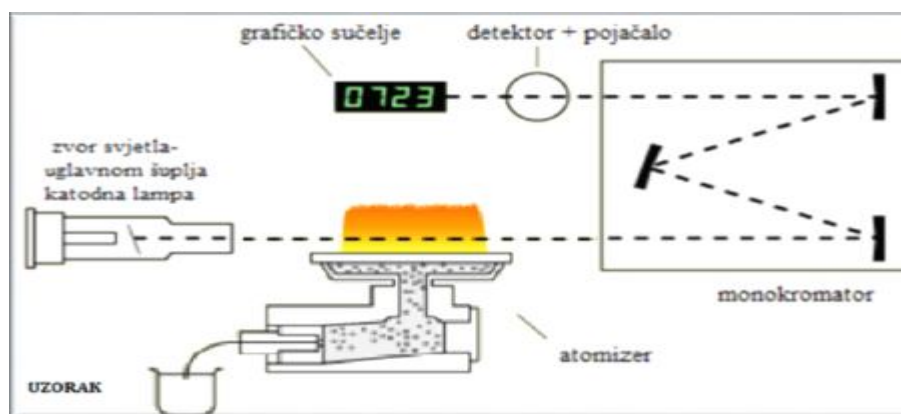
Izvor svjetlosti (1) predstavlja šuplja katodna žarulja ili žarulja s električnim pražnjenjem, koja sadrži katodu presvučenu metalom koji se analizira. Kada se atomi metala u toj katodi pobude električki, oni emitiraju zračenje uske vrpce na valnoj duljini na kojoj apsorbiraju analizirani atomi u plamenu ili grafitnoj peći (2). Monokromator (3) odabire usku vrpcu zračenja koje emitira žarulja sa šupljom katodom. Na ovaj način zaustavlja se interferirajuće zračenje plamena. Valna duljina svjetlosti koju je izolirao monokromator, usmjerena je na detektor (4) koji je zapravo „oko“ instrumenta. Obično je to fotomultiplicirajuća cijev, koja ovisno o intenzitetu svjetlosti, stvara električnu struju. Instrumentom elektronikom, struja se pretvara u signal koji obradom (5) može biti mjera koncentracije (Nigović, 2014; Beaty i Kerber, 1993).

1.1.5. Tehnike za određivanje metala

Na temelju načina atomizacije razlikujemo nekoliko tehnika za određivanje metala:

- (i) plamena (engl. *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*, FAAS),
- (ii) grafitna (engl. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*, GF AAS),
- (iii) hidridna (engl. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy*, HG AAS),
- (iv) induktivno spregnuta plazma-atomska emisijska spektrometrija (engl. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*, ICP-AES) i
- (v) induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS).

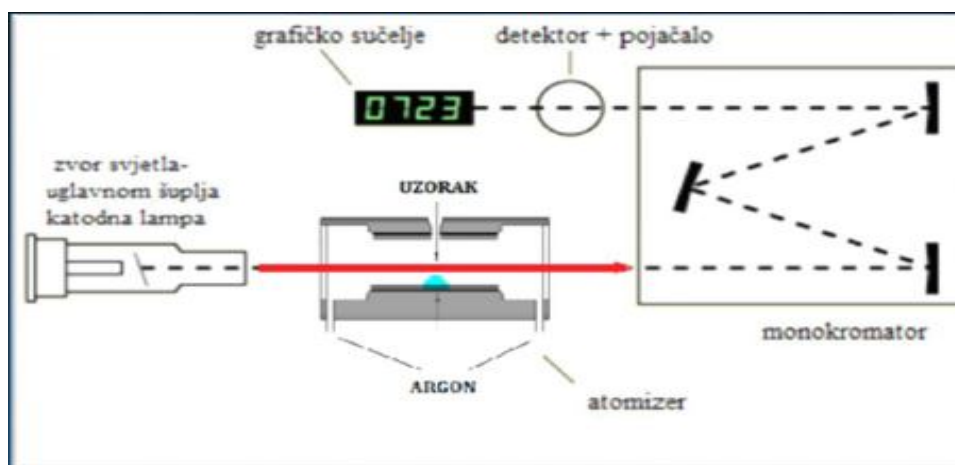
Plamena tehnika brza je i jeftina metoda analize metala za koju je potrebno nekoliko sekundi. Ovom tehnikom određuje se jedan po jedan element, a nivo detekcije je ppb – mg/L. Potrošnja plinova prilikom izvođenja analize je niska, a sama metoda je relativno lagane izvedbe. Plinovi u gorioniku stvaraju podtlak koji uvlači uzorak iz posude. Tekućina se prenosi u plamen gdje se atomizira. Tako nastali atomi apsorbiraju svjetlost iz izvora (Slika 5.) (Welz i Sperling, 1997).



Slika 5. Princip FAAS (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

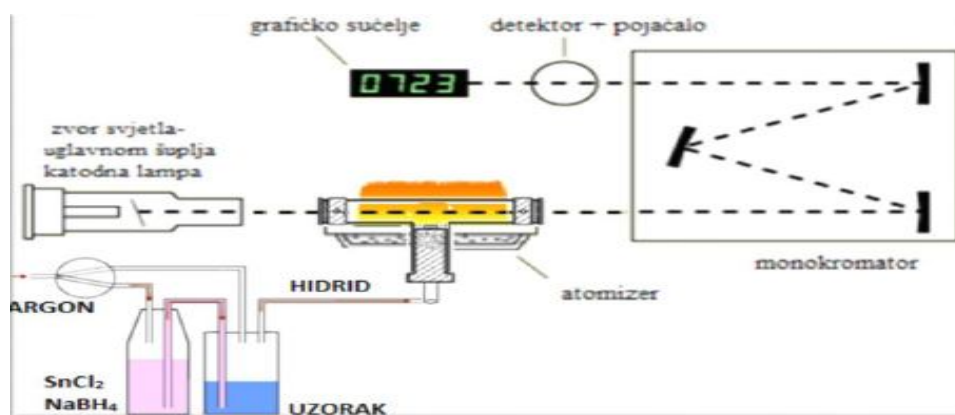
Grafitna tehnika sporija je tehnika od prethodno navedene plamene tehnike, odnosno potrebne su minute po analizi. Također, određuje se jedan po jedan element te ima niske granice određivanja za većinu elemenata, ppb - $\mu\text{g/L}$. Za provedbu analize grafitnom tehnikom dovoljne su male količine uzorka (mL), ali je cijena po analizi veća nego kod plamene tehnike. Za provedbu postupka neophodno je veće iskustvo u radu, a sam postupak se sastoji

od: injiciranja, sušenja, pirolize, atomizacije, čišćenja atomizatora i hlađenja (Slika 6.) (Welz i Sperling, 1997).



Slika 6. Princip GF AAS (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

Hidridna tehnika primjenjiva je određivanje lakohlapljivih elementa poput Sb, As, Bi, Ge, Pb, Se, Sn, Te koji se različitim reducensima (NaBH_4 , SnCl_2) mogu prevesti u oblik hidrida. Tako nastali hidridi skupljaju se i plinovitom strujom dolaze u kvarcnu cijev koja se zagrijava te hidridi disociraju u slobodne atome (Slika 7.) (Welz i Sperling, 1997).



Slika 7. Princip HG AAS (izvor: Amidžić Klarić, 2016)

Koncentracija žive u različitim uzorcima određuje se *tehtnikom hladnih para*, budući da je živa izuzetak čiji slobodni atomi mogu postojati na sobnoj temperaturi. Moguće ju je mjeriti atomskom apsorpcijom bez zagrijavanja ćelije s uzorkom. Potrebno ju je reducirati, a jako visoki napon para prenosi ju u apsorpcijsku ćeliju (Welz i Sperling, 1997).

1.1.6. Priprema uzoraka u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji

Kako se uzorak atomizacijom pretvara u slobodne atome neovisno o početnom stanju uzorka, priprema uzorka obično je jednostavna (Lewinson, 2001). Neke uzorke (poput bioloških tekućina) dovoljno je tek razrijediti prikladnom otopinom, zagrijati za prekoncentraciju ili izvršiti djelomično ili potpuno otapanje uzorka. No za pripremu većine uzoraka potreban je dodatak reagensa i primjena dovoljne količine energije da bi se pokidale veze i kristalna struktura čvrstih tvari. Ukoliko je potrebno, moguće je koristiti i dodatne reagente za dobivanje analita iz otopine. Dva osnovna postupka korištena za pripremu uzorka su *suho i vlažno otapanje*.

Tehnike suhog otapanja su fuzija (*fusion*) i suho spaljivanje (*dry ashing*). Suho spaljivanje koje se koristi za eliminaciju ili minimalizaciju organskih minerala prije određivanja mineralnih elemenata vrši se spaljivanjem organskih spojeva na zraku ili pari kisika. Kod mokrog otapanja, za razgradnju organskih uzoraka prije određivanja sadržaja metala ili za ekstrakciju metala iz anorganskih matriksa što omogućuje njihovo određivanje, koriste se oksidansi. U procesu mokrog otapanja koriste se koncentrirane kiseline i zagrijavanje (različiti izvori energije: termalna, ultrazvučna i energija zračenja) (Oliviera, 2013).

Procesi razgradnje organske tvari u složenim matriksima redovito se provode u

- (i) otvorenim posudama korištenjem kiselina, kiselih smjesa ili bazičnih reagensa na vrućim pločama ili
- (ii) mikrovalnim pećima u otvorenim i zatvorenim posudama.

Razgradnja organske tvari u otvorenom sustavu je težak, dugotrajan proces sklon sustavnim izvorima pogrešaka, tj. gubitkom onečišćenja ili analita. U slučaju korištenja mikrovalnog zračenja, visoka cijena pećnica za mikrovalno spaljivanje uzoraka i razrjeđivanje uzorka mogu se smatrati glavnim nedostacima mikrovalne digestije. Iako je količina uzorka u posudama ograničena zbog stvaranja plinovitih reakcijskih produkata koji mogu povećati tlak, upotreba zatvorenih visokotlačnih posuda prikladna je za učinkovitu razgradnju uzorka. S druge strane, prednosti u korištenju mikrovalnih pećnica s otvorenim sustavom su: smanjenje rizika provođenja postupka, moguće uvođenje reagensa tijekom postupka, mogućnost razgradnje velikih količina uzorka i kratkog vremena hlađenja (Sant'Ana i sur., 2007).

1.2. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje je oduvijek bila važna namirnica u svakodnevnoj prehrani mediteranskog stanovništva, a od polovice dvadesetog stoljeća prelazi okvire mediteranskog bazena i postaje sve zastupljenije širom svijeta.

Maslinovo ulje je jestivo ulje koje se dobiva iz ploda drveta masline, *Olea europea sativa*. Ova važna namirnica mediteranske prehrane bogata je masnim kiselinama i vitaminom E. U sastavu masnih kiselina maslinovog ulja prevladava jednostruko nezasićena oleinska kiselina, a manji udio imaju zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska te višestruko nezasićene masne kiseline linolna i α -linolenska, koje kao esencijalne masne kiseline daju posebno biološko značenje maslinovom ulju. Njegova konzumacija povezana je sa smanjenim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti, karcinoma te niza drugih bolesti. Posljednja istraživanja dokazuju da polifenoli inhibiraju oksidacijske procese LDL-a te pokazuju druge biološke učinke koji imaju povoljne učinke na ljudsko zdravlje.

Budući da je dijetoterapeutski učinak maslinovog ulja na ljudski organizam direktno proporcionalan njegovoj kakvoći vrlo je važno postaviti standarde koji je definiraju. Kvalitetu maslinovog ulja moguće je definirati iz trgovačke, nutritivne i senzorske perspektive.

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN/7/09), koji je izrađen prema međunarodnim smjernicama, definirani su osnovni pokazatelji kakvoće maslinovog ulja: udio ukupnih slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, koeficijenti ekstincije K_{232} i K_{270} i organoleptička svojstva. Osim toga, analiza teških metala i elemenata u tragovima predstavlja važnu stavku u karakterizaciji ulja, te otkrivanju krivotvorenih ulja koji se mogu naći na tržištu (Zeiner et al., 2005).

Međunarodno vijeće za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC) definiralo je najviše dozvoljene koncentracije metala u maslinovom ulju (NDK, engl. *Maximum permissible concentration*). Najveća dozvoljena koncentracija arsena, olova i bakara u maslinovim uljima je 0,1 mg/kg. Propisi Republike Hrvatske, kao države članice ovog Vijeća, u skladu su s navedenim kriterijima. U Tablici 1. sustavno su prikazana dosadašnja provedena istraživanja u cilju određivanja različitih metala u maslinovom ulju nakon procedure mikrovalne digestije.

Tablica 1. Pregled određivanja metala u maslinovom ulju nakon procedure mikrovalne digestije.

| Metal | Tehnika određivanja metala u maslinovom ulju | Procedura mikrovalne digestije | Korištene kemikalije | Literaturni navod |
|---|---|--|---|---------------------------------------|
| Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn | GF-AAS | 130 °C 10 min. 140 psi, 150 °C 10 min. 200 psi, 10 min. hlađenje, 160 °C 20 min. 200 psi | HNO ₃ | Bağdat Yaşar i Güçer, 2004 |
| As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Eu, Gd, Fe, Mg, Mn, Ni, Sb, Sc, Se, Sm, Sr, Y | ICP-MS | 250 W 4 min., 0 W 4 min., 250 W 5 min., 400 W 7 min., 700 W 6 min., 350 W 5 min. | HNO ₃ | Benincasa i sur., 2007 |
| Ag, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Ti, Tl, V | ICP-MS | od 25 do 90 °C 5 min. 700 W, konstantno 90 °C 3 min. 600 W, od 90 do 170 °C 10 min. 600 W, konstantno 170 °C 7 min. 600 W | HNO ₃ | Llorent-Martinez i sur., 2011a, 2011b |
| Cd, Cu, Pb, Zn | ICP-OES | 300 W (83%) 15 min., 600 W (75%) 10 min., 1200 W (65%) 15 min., 300 W (83%) 5 min. | HNO ₃ –H ₂ O ₂ | Angioni i sur., 2006 |
| Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Zn | ICP–AES i GF-AAS | 250 W 2 min., 0 W 1 min., 250 W 2 min., 600 W 1 min., 400 W 5 min., ventiliranje: 3min. | HNO ₃ –H ₂ O ₂ | Cindrić i sur., 2007 |
| Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, Zn | FA-AAS i GF-AAS | 250 W 2 min., 0 W 2 min., 250 W 6 min., 400 W 5 min., 550 W 8 min., ventiliranje: 8 min | HNO ₃ –H ₂ O ₂ | Mendil i sur., 2009 |
| Cu, Fe, Ni, Zn | HR-CS FAAS | 750 W 90 °C 6 min., 750 W 90 °C 4 min., 1000 W 180 °C 8 min., 1000 W 180 °C 15 min. (35 bar), ventiliranje: 20 min | HNO ₃ –H ₂ O ₂ | Nunes i sur., 2011 |

Legenda: FA-AAS – plamena tehnika; GF-AAS – grafitna tehnika; ICP–AES - induktivno spregnuta plazma-atomska emisijska spektrometrija; ICP-OES - induktivno spregnuta plazma – optičko emisijska spektrometrija; ICP-MS – induktivno spregnuta plazma-masena spektrometrija; HR-CS FAAS - engl. *High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry*

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Budući da teški metali i elementi u tragovima imaju negativne učinke na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje, metali su jedna od važnih sastavnica u procjeni kvalitete maslinovih ulja. Sastav metala u maslinovim uljima ovisi o različitim čimbenicima, kao npr. o sorti masline, agronomskim uvjetima i tehnologiji dobivanja ulja, a određivanje njihovog sadržaja je od velike važnosti. U analitičkom pogledu, određivanje metala u maslinovom ulju predstavlja težak i zahtjevan analitički problem zbog složenog organskog matriksa ovog tradicionalnog ulja na području Mediterana.

Iz navedenih razloga, cilj ovog rada bio je

- odrediti prisustvo metala, odnosno koncentraciju arsena, bakra i olova u maslinovom ulju te procijeniti kvalitetu ispitivanih maslinovih ulja s područja Republike Hrvatske;
- usporediti dobivene koncentracije gore navedenih metala s njihovim najvećim dozvoljenim koncentracijama (NDK, engl. *Maximum permissible concentration*) u maslinovom ulju, koje su propisane pravilnicima Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council, IOOC*).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci maslinovog ulja

- 35 uzoraka maslinovog ulja sakupljenih iz različitih dijelova Republike Hrvatske

3.1.2 Radni instrumenti

- Atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Pećnica za mikrovalno spaljivanje uzoraka ETHOS UP (Milestone, Sorisole, Italija)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska)
- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

3.1.3 Standardne supstancije

- Standardna otopina bakra (koncentracija: 1000 ± 0.002 mg/L) (Panreac, Barcelona, Španjolska)
- GF-AAS smjesa standarda: aluminij, arsen, barij, kadmij, kobalt, kositar, krom, nikal, olovo, selenij, silicij i srebro (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)

3.1.4 Ostale korištene kemikalije

- Modifikatori matriksa: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ i $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Nitratna kiselina TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, 65-71%, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Vodikov peroksid TraceSELECT® Ultra, za analizu elemenata u tragovima, $\geq 30\%$, (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs, Švicarska)
- Voda: za pripremu svih otopina korištena je ultračista voda otpornosti $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ (25°C) dobivena korištenjem Milipore sustava za pročišćavanje (Bedford, MA, SAD)

3.1.5 Pribor i posuđe

- Grafitne kivete - THGA (End Cap) (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Lampa sa šupljom katodom HCL (engl. *Hollow Cathode Lamp*) – pojedinačna lampa za bakar (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- EDL (engl. *Electrodeless Discharge Lamp*) lampe za pojedinačne elemente: arsen i olovo (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- PTFE posuđe za mikrovalno spaljivanje (Milestone, Sorisole, Italija)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Plastične odmjerene tikvice (Vitlab, Grobostheim, Njemačka)

- Plastična posuda za grafitnu tehniku
- Kapaljke (ISOLAB, Wertheim, Njemačka)

3.1.6 Programski paketi

- AA WinLab Version 32 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- EasyControl software (Milestone, Sorisole, Italija)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica ver. 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, SAD)

3.2 Metode

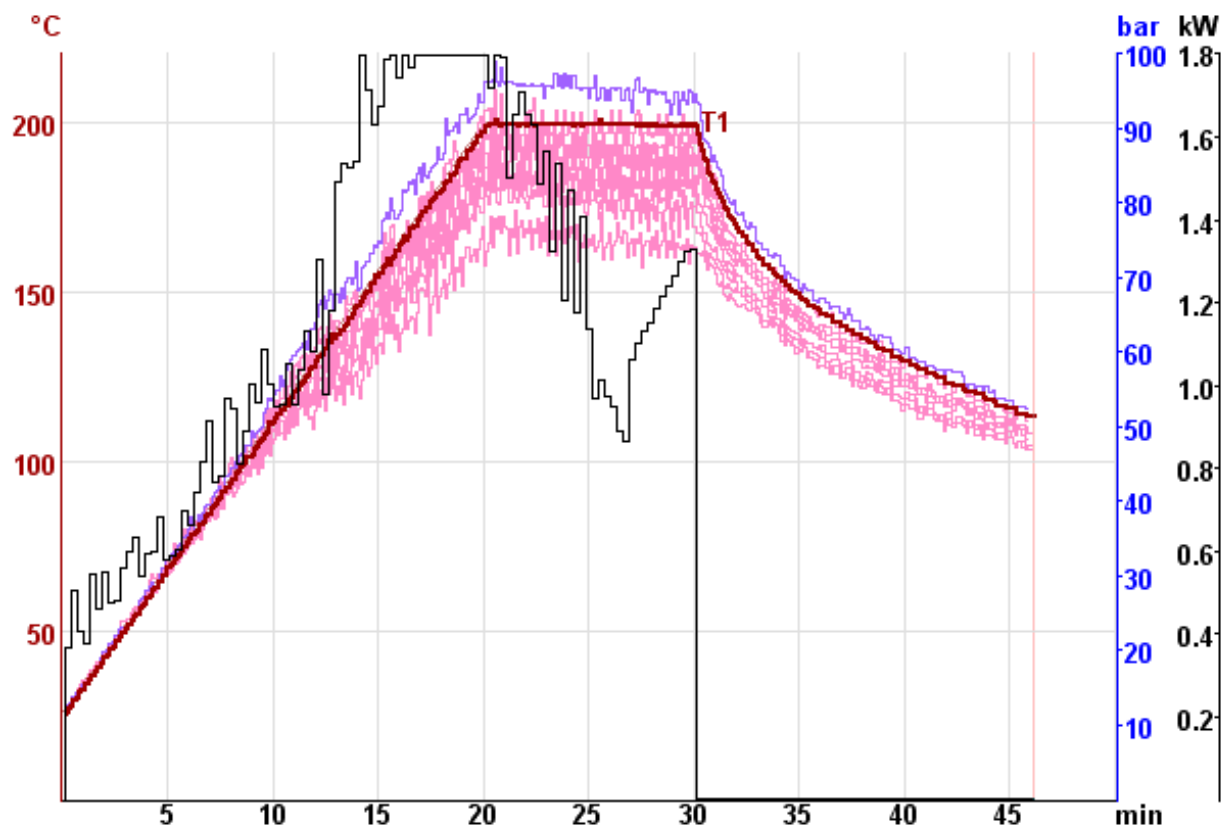
3.2.1 Spaljivanje uzorka mikrovalnom digestijom

Budući da uzorci maslinovog ulja sadrže visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala, u cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Ukratko, 0,2 – 0,3 g uzorka odvagano je u PTFE posudu za mikrovalno spaljivanje te dodano 9 mL nitratne kiseline (65-71%) TraceSELECT® Ultra i 1 mL vodikov peroksid ($\geq 30\%$) TraceSELECT® Ultra za analizu elemenata u tragovima. Zatim su PTFE posude zatvorene te proveden program mikrovalne digestije (Tablica 2.). Nakon spaljivanja i hlađenja, uzorak je kvantitativno prenesen u plastičnu odmjernu tikvicu, nakon čega je slijedio postupak određivanja metala grafitnom tehnikom.

Tablica 2. Program mikrovalne digestije

| Korak | Vrijeme | Temperatura (°C) | Snaga (W) |
|-------|----------|------------------|-----------|
| 1 | 00:20:00 | 200 | 1800 |
| 2 | 00:10:00 | 200 | 1800 |



Slika 8. Grafički prikaz svih reakcijskih parametara tijekom mikrovalnog spaljivanja uzorka maslinovog ulja

3.2.2 Analize metala u maslinovom ulju grafitnom tehnikom

Metodama grafitne tehnike, GF-AAS, određene su koncentracije arsena, bakra i olova. Kao inertni plin nositelj u svim analizama grafitne tehnike korišten je argon. Kao izvor zračenja za sve metode atomske apsorpcije korištene su pojedinačne lampe za određeni element, a za potrebe provedbe analize korišteno je PVC laboratorijsko posuđe. Prikladni laboratorijski pribor i posuđe držani su 24 sata prije upotrebe u 5% HNO_3 , zatim isprani ultračistom vodom te korišteni u provedbi analize.

3.2.3. Priprema standardnih otopina

Radne otopine analiziranih metala za izradu baždarnog pravca pripremljene su razrjeđivanjem standardne otopine As, Cu i Pb ultračistom vodom u prikladnom omjeru, a koncentracije korištenih radnih otopina metala prikazane su u Tablici 3.

Nadalje, radne otopine modifikatora matriksa korištene u analizi metala grafitnom tehnikom pripremljeni su razrjeđivanjem s ultračistom vodom u odgovarajućem omjeru. Analitički parametri za određivanje metala u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Analitički parametri za određivanje metala u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom

| Element | As | Cu | Pb |
|------------------------------------|---|---|---|
| Valna duljina (nm) | 193,7 | 324,8 | 283,3 |
| Otvor pukotine monokromatora (nm) | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| Lampa | EDL | HCL | EDL |
| Struja lampe (mA) | 380 | 15 | 440 |
| Tip signala | AA-BG | AA-BG | AA-BG |
| Način mjerenja | površina pika | površina pika | površina pika |
| Vrijeme mjerenja (s) | 5 s | 5 s | 5 s |
| Standard (µg/L) | 10, 20, 30, 40 | 5, 10, 15, 20 | 10, 20, 30, 40 |
| Injektirani volumen uzorka (µL) | 20 | 20 | 20 |
| Modifikator matriksa | 0,005 mg Pd(NO ₃) ₂ i 0,003 mg MgNO ₃ | 0,05 mg NH ₄ H ₂ PO ₄ i 0,003 mg MgNO ₃ | 0,05 mg NH ₄ H ₂ PO ₄ i 0,003 mg MgNO ₃ |
| Volumen modifikatora matriksa (µL) | 5 | 5 | 5 |

Legenda: AA - atomska apsorpcija; BG - pozadinska korekcija

4 REZULTATI I RASPRAVA

Analize teških metala arsena i olova te bakra, elementa u tragovima, u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedene su metodama atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom na instrumentu AAnalyst 800 THGA (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD).

Provedena je kalibracija već postojećih metoda (Perkin Elmer, 2000; Welz i Sperling 1997), te su ispitane validacijske značajke: radno područje, linearnost, granica dokazivanja i određivanja (Tablica 4.).

Pri tome je granica dokazivanja (LOD) i određivanja (LOQ) za svaki analit određena uzastopnim mjerenjem (n=10) slijepe probe te izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija mjerenja. Trostruka vrijednost standardne devijacije uzeta je kao LOD, a deseterostruka vrijednost standardne devijacije kao LOQ.

Nakon toga provedena je analiza uzoraka. U uzorcima je prije provedbe analize provedena mineralizacija procedurom mikrovalne digestije (poglavlje 3.2.1). Koncentracija metala prisutna u uzorku maslinovog ulja određena je iz kalibracijske krivulje, ovisnosti površine pika o koncentraciji metala. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5.

Tablica 4. Značajke validacije za određivanje metala u maslinovom ulju GF-AAS tehnikom

| Element | As | Cu | Pb |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Radno područje (µL/L) | 10 - 40 | 5 - 20 | 10 – 40 |
| Kalibracijska krivulja (n=4) | $y = 0,00257x + 0,00032$ | $y = 0,00476x + 0,00002$ | $y = 0,00246x + 0,00077$ |
| Koeficijent korelacije | 0,99975 | 0,99988 | 0,99985 |
| LOD (µg/kg) ^a | 7,5 | 15,0 | 9,0 |
| LOQ (µg/kg) ^a | 25,0 | 50,0 | 30,0 |
| LOD (µg/L) ^b | 0,09 | 0,15 | 0,075 |
| LOQ (µg/L) ^b | 0,3 | 0,5 | 0,25 |

^a na temelju odvage 0,250 g uzorka

^b na temelju odgovarajuće slijepe probe

Primjena pesticida, fungicida i gnojiva koji sadrže olovo, kadmij, mangan, bakar i cink tijekom uzgoja ploda masline značajno povećavaju količinu ovih metala u maslinovom ulju. Također, smještenost maslinika blizu prometnica ili industrijske zone utječe na sadržaj kadmija i olova u ovoj namirnici. Koncentracija **olova** u 24 uzoraka maslinovog ulja kretala se u rasponu od 30,61 µg/kg do 86,90 µg/kg uz SV od 60,06 µg/kg (RSD: 0,78 - 10,14%), dok je u ostalih 11 uzorka bila ispod LOQ (30,0 µg/kg), Tablica 5. Dobiveni rezultati u skladu s literaturnim podacima za španjolska i turska maslinova ulja (Llorent-Martinez et al., 2011a, 2011b; Mendil et al, 2009). Najviša dozvoljena koncentracija olova u maslinovim uljima je 100 µg/kg. Sva analizirana maslinova ulja imala su koncentraciju ovog teškog metala ispod NDK.

Činjenica je kako je **arsen** izrazito toksičan i u malim dozama, jer je njegova letalna doza veoma mala, 700 mg/kg (ingestija). U prirodi se ovaj element nalazi u anorganskom i organskom obliku. Također, za organske oblike smatra se da su relativno netoksične osim onih dobivenih sintetskim putem i razvijenih kao sastavnica pesticida. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog rad bio odrediti količinu arsena u ovoj vrsti ulja. Koncentracija arsena u ispitivanim uzorcima maslinovog ulja nije detektirana grafitnom tehnikom niti u jednom uzorku. Budući da je granica dokazivanja predložene metode LOD 0,09 µg/L, odnosno LOD 7,5 µg/kg na temelju odvage 0,250 g uzorka, sa sigurnošću se može utvrditi da je prisustvo ovog toksičnog metala u istraživanim maslinovim uljima daleko ispod najviše dozvoljene koncentracije (100 µg/kg) u ovoj vrsti ulja na području Republike Hrvatske. Osim toga, može se pretpostaviti da tijekom uzgoja masline nisu korišteni pesticidi koji sadrže ovaj toksični element.

U literaturi su dostupni brojni podaci o negativnim učincima elemenata u tragovima na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje zato je koncentracija navedene skupine metala u maslinovom ulju jedan je od parametara kvalitete ovog tradicionalnog ulja. Oksidacija koja vodi do razvoja nepovoljnih mirisa i okusa jedan je od glavnih razloga smanjene kvalitete maslinovih ulja. Čimbenici koji najviše utječu na brzinu oksidacije su: stupanj nezasićenosti, količina kisika, temperatura, svjetlost i prisutnost metala (uglavnom prijelaznih metala kao što su Fe i Cu). Navedeni metali povećavaju brzinu oksidacije jestivih ulja povećavanjem stvaranja slobodnih radikala iz masnih kiselina ili hidroperoksida kao primarnih proizvoda autooksidacije (Meira i sur., 2011; Benedet & Shibamoto, 2008; Sikwese & Duodu, 2007).

Sadržaj **bakra** u maslinovom ulju rezultat je prirodnog porijekla ovog elementa u tragovima iz ploda masline i antropogenih izvora. Koncentracija bakra u 10 analiziranih maslinovim uljima bila je ispod granice određivanja (LOQ = 50,0 µg/kg) za predloženu GF-AAS metodu, dok se kvantificirane vrijednost u ostalih 25 uzoraka ovog ulja kretale do 99,31 µg/kg, uz SV od 74,77 µg/kg (RSD: 0,16 - 5,17 %), Tablica 5. Budući da je NDK bakra u maslinovom ulju 100 µg/kg, koncentracija bakra u ispitivanim uzorcima bila je ispod dozvoljenih vrijednosti. Osim toga, primijećeno je kako se dobiveni raspon za koncentracije bakra u maslinovim uljima u potpunosti slaže sa španjolskim (do 15,5 ng/g) i turskim (SV: 0,71 µg/g) maslinovim uljima (Llorent-Martinez et al., 2011a, 2011b; Mendil et al, 2009).

Tablica 5. Koncentracija metala u analiziranim maslinovim uljima

| Metal | Incidencija* (%) | SV (µg/kg) | Medijan (µg/kg) | Raspon kvantificiranih vrijednosti (µg/kg) | Interkvartil (µg/kg) | RSD (%) | NDK (µg/kg) |
|-------|------------------|--------------------|-----------------|--|----------------------|------------|-------------|
| As | 0 (0 %) | < LOQ (25,0 µg/kg) | | | | - | 100 |
| Cu | 25 (71 %) | 74,77 | 76,93 | 54,78-99,31 | 61,00-85,32 | 0,16-5,17 | 100 |
| Pb | 24 (69 %) | 60,06 | 59,99 | 30,61-86,90 | 50,31-71,55 | 0,78-10,14 | 100 |

Legenda:

*Incidencija = [(broj uzoraka u kojima je kvantificirana vrijednost analita)/(ukupan broj analiziranih uzoraka)]*100; ukupan broj analiziranih uzoraka = 35.

SV – srednja vrijednost triplikata; NDK – najviša dozvoljena koncentracija metala u maslinovom ulju (engl. *Maximum permissible concentration*) ustanovljeno od Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje (engl. *International Olive Oil Council*, IOOC); RSD – relativna standardna devijacija tri mjerenja

5 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave moguće je zaključiti sljedeće:

1. Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom.
2. Niske RSD vrijednosti upućuju na iznimnu/zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom.
3. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK proveden metode grafitne tehnike mogu se smatrati prikladnim za određivanje analiziranih metala u maslinovim uljima.
4. Koncentracije analiziranih metala u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod njihovih najviših dozvoljenih koncentracija definiranih važećim pravilnikom te upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja.
5. Koncentracije arsena, bakra i olova u maslinovim uljima porijeklom iz Republike Hrvatske ne razlikuju se u odnosu na maslinova ulja porijeklom iz drugih zemalja.

Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.

6 LITERATURA

Amidžić Klarić D, Primjena atomske spektrometrije u kontroli kvalitete lijekova i dodataka prehrani, predavanje, *Hrvatsko farmaceutsko društvo*, 2016.

Angioni A, Cabitza M, Russo MT, Caboni P. Influence of Olive Cultivars and Period of Harvest on the Contents of Cu, Cd, Pb, and Zn in Virgin Olive Oils. *Food Chem*, 99, 2005, 525-529.

Bağdat Yaşar S, Güçer Ş Fractionation Analysis of Magnesium in Olive Products by Atomic Absorption Spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2003, 505, 43-49.

Bağdat Yaşar S, Köse Baran E, Alkan M. Metal Determinations in Olive Oil. U: Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Dimitrios B, urednik, Rijeka, InTech, 2012, str. 89-110.

Beatty RD, Kerber JD. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, The Perkin - Elmer Corporation, 1993, str. 1-1 – 1-6; 2-1 – 2-9; 3-1 – 3-2; 4-1 – 4-5.

Benedet JA, Shibamoto T. Role of Transition Metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in Lipid Peroxidation. *Food Chem*, 2007, 107, 165-168.

Benincasa C, Lewis J, Perri E, Sindona G, Tagarelli A. Determination of Trace Element in Italian Virgin Olive Oils and Their Characterization According to Geographical Origin by Statistical Analysis. *Anal Chim Acta*, 2006, 585, 366-370.

Cindrić IJ, Zeiner M, Steffan I. Trace Elemental Characterization of Edible Oils by ICP-AES and GFAAS. *Microchem J*, 2006, 85, 136-139.

Codex standard for olive oils and olive pomace oils, 1981., <http://www.fao.org>, pristupljeno 14.07.2017.

Lewinson R. More Modern Chemical Techniques. *Roy Soc Chem*, 2001, str. 1-4.

Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Fernandez-de Cordóva ML, Dominguz-Vidal A, Ruiz-Medina A. Analysis of the Legistated Metals in Different Categories of Olive and Olive-pomace Oils. *Food Control*, 22, 2010, 221-225.

Llorent-Martinez EJ, Ortega-Barrales P, Fernandez-de Cordóva ML, Dominguz-Vidal A, Ruiz-Medina A. Investigation by ICP-MS of Trace Element Levels in Vegetable Edible Oils Produced in Spain. *Food Chem*, 2011, 127, 1257-1262.

Meira M, Quintella CM, dos Santos Tanajura A, da Silva HGR, Fernando JDS, da Costa Neto PR, Pepe JM, Santos MA, Nascimento LL. Determination of the Oxidation Stability of Biodiesel and Oils by Spectrofluorimetry and Multivariate Calibration. *Talanta*, 2011, 85, 430-434.

Mendil D, Uluözlü ÖD, Tüzen M, Soylak M. Investigation of the Levels of Some Element in Edible Oil Samples Produced in Turkey by Atomic Absorption Spectrometry. *J Hazard Mater*, 2008, 165, 724-728.

Nigović B, Analitika lijekova, Predavanja iz analitike lijekova, skripta, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014.

Nunes LS, Barbosa JTP, Fernandes AP, Lemos VA, dos Santos WNL, Korn MGA, Teixeira LSG. Multi-element Determination of Cu, Fe, Ni and Zn Content in Vegetable Oils Samples by High-resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry and Microemulsion Sample Preparation. *Food Chem*, 2010, 127, 780-783.

Oliveira E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. *J Braz Chem Soc*, 2003, 14, 174- 182.

Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, 2009, Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN/7/2009).

Sant'Ana FW, Santelli RE, Cassella AR, Cassella RJ. Optimization of an open-focused microwave oven digestion procedure for determination of metals in diesel oil by

inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *JHazard Mater*, 2007, 149, 67–74.

Sikwese FE, Duodu KG. Antioxidant Effect of A Crude Phenolic Extract from Sorghum Bran in Sunflower Oil in the Presence of Ferric Ions. *Food Chem*, 2007, 104, 324-331.

Welz B, Sperling M. Atomabsorptions-spektrometrie. 4. Neubearbeitete Auflage, Weinheim, Wiley-VCH, 1997, str.4.

Zeiner M, Steffan I, Juranovic Cindric I. Determination of trace elements in olive oil by ICP - AES and ETA – AES. *Microchem J*, 2005, 81, 171-176.

7 SAŽETAK/SUMMARY

Budući da teški metali i elementi u tragovima imaju negativne učinke na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je odrediti koncentracije metala važnih u procjeni kvalitete maslinovih ulja.

Analize teških metala arsena i olova te bakra, elementa u tragovima, u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedene su metodama atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom. Uzorci maslinovog ulja sadrže visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala, u cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom. Niske RSD vrijednosti upućuju na iznimnu/zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK, provedene metode grafitne tehnike mogu se smatrati prikladnim za određivanje analiziranih metala u maslinovim uljima. Koncentracije analiziranih metala u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod njihovih najviših dozvoljenih koncentracija definiranih važećim pravilnikom te upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja.

Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.

Since heavy metals and trace elements have negative effects on the oxidative stability of olive oil and human health, the aim of this study was to determine the concentrations of metals important for the assessment of olive oil quality.

The analysis of heavy metals: arsenic and lead and copper, trace element, in 35 samples of olive oil, originating from the Republic of Croatia, were performed by atomic absorption spectrometry using graphite technique. Samples of olive oil contain a high proportion of lipid components, and thus represent a complex organic system for the determination of metal. In order to obtain a homogeneous solution suitable for the determination of metal by graphite technique, all analyzed samples were previously burned by microwave digestion.

The research has shown the advantages of metal concentration determination by graphite technique after removal of complex matrix by burning samples by microwave-assisted digestion. Low RSD values point out the exceptional/satisfactory repeatability of microwave digestion procedures and the metal concentration determination by graphite technique. Based on the obtained LOD and LOQ values as well as the defined NDK, conducted graphite technique methods can be considered as suitable to determine the analyzed metals in olive oils. The concentrations of the analyzed metals in the investigated olive oils were below their maximum permissible concentrations as defined by the valid rulebook. The presented data point to the exceptional quality of Croatian olive oils.

Further research should be conducted to evaluate the presence of other metals in the investigated olive oil samples.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA
KARTICA/BASIC
DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje metala u maslinovom ulju primjenom atomske apsorpcijske spektrometrijske tehnike

Antonija Hrnjkaš

SAŽETAK

Budući da teški metali i elementi u tragovima imaju negativne učinke na oksidativnu stabilnost maslinovog ulja i ljudsko zdravlje, cilj ovog rada bio je odrediti koncentracije metala važnih u procjeni kvalitete maslinovih ulja.

Analize teških metala arsena i olova te bakra, elementa u tragovima, u 35 uzoraka maslinovog ulja porijeklom iz Republike Hrvatske provedene su metodama atomske apsorpcijske spektrometrije grafitnom tehnikom. Uzorci maslinovog ulja sadrže visoki udio lipidnih sastavnica te predstavljaju složen organski sustav za određivanje metala, u cilju dobivanja homogene otopine prikladne za određivanje metala grafitnom tehnikom svi analizirani uzorci prethodno su spaljeni mikrovalnom digestijom.

Provedenim istraživanjem uočene su prednosti određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom nakon uklanjanja složenog matriksa spaljivanjem uzoraka mikrovalnom digestijom. Niske RSD vrijednosti upućuju na iznimnu/zadovoljavajuću ponovljivost i postupka mikrovalne digestije i određivanja koncentracije metala grafitnom tehnikom. Na temelju dobivenih vrijednosti LOD i LOQ te definirane NDK proveden metode grafitne tehnike mogu se smatrati prikladnim za određivanje analiziranih metala u maslinovim uljima. Koncentracije analiziranih metala u istraživanim maslinovim uljima bile su ispod njihovih najviših dozvoljenih koncentracija definiranih važećim pravilnikom te upućuju na iznimnu kvalitetu hrvatskih maslinovih ulja.

Potrebna su daljnja istraživanja u okviru zastupljenosti drugih metala u maslinovom ulju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranice, 8 grafičkih prikaza, 5 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: metali, maslinovo ulje, onečišćenja, grafitna AAS, mikrovalna digestija

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *znanstvena suradnica*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *znanstvena suradnica*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of metals in olive oil using atomic absorption spectrometry

Antonija Hrnjkaš

SUMMARY

Since heavy metals and trace elements have negative effects on the oxidative stability of olive oil and human health, the aim of this study was to determine the concentrations of metals important for the assessment of olive oil quality. The analysis of heavy metals: arsenic and lead and copper, trace element, in 35 samples of olive oil, originating from the Republic of Croatia, were performed by atomic absorption spectrometry using graphite technique. Samples of olive oil contain a high proportion of lipid components, and thus represent a complex organic system for the determination of metal. In order to obtain a homogeneous solution suitable for the determination of metal by graphite technique, all analyzed samples were previously burned by microwave digestion.

The research has shown the advantages of metal concentration determination by graphite technique after removal of complex matrix by burning samples by microwave-assisted digestion. Low RSD values point out the exceptional/satisfactory repeatability of microwave digestion procedures and the metal concentration determination by graphite technique. Based on the obtained LOD and LOQ values as well as the defined NDK, conducted graphite technique methods can be considered as suitable to determine the analyzed metals in olive oils. The concentrations of the analyzed metals in the investigated olive oils were below their maximum permissible concentrations as defined by the valid rulebook. The presented data point to the exceptional quality of Croatian olive oils.

Further research should be conducted to evaluate the presence of other metals in the investigated olive oil samples.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 8 figures, 5 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: metals, olive oil, impurities, graphite furnace AAS, microwave digestion

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Research Associate*

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Research Associate*

Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.